

**GENETSKA KARAKTERIZACIJA BUŠE TEMELJENA NA
POLIMORFIZMU PROTEINA KRVI****A. Ivanković, P. Caput, M. Konjačić, P. Mijić****Sažetak**

Buša je jedna od autohtonih hrvatskih pasmina goveda koja je nestajala minulih desetljeća i dovedena na rub opstanka. Upravo se stoga na bušu, koja je do sredine dvadesetog stoljeća dominirala u govedarskoj proizvodnji, usredotočio znanstveni i javni interes. Nakon što su učinjena prva istraživanja eksterijernih odlika buše, nastoji se spoznati njena genetska struktura, na osnovi čega se može objektivnije odrediti genetska čistoća preostale populacije, te učinkovitije pristupiti njenoj zaštiti i revitalizaciji. Istražen je polimorfizam četiriju proteina krvi (Hb, Tf, Alb i Pa) pri čemu je utvrđena polimorfnost na svim lokusima. Utvrđena je frekvencija dviju alelnih varijanti za Hb (0,9655; 0,0345), triju varijanti za Tf (0,3448; 0,5862; 0,0690), te dviju za Alb (0,9310; 0,0690) i Pa (0,2069; 0,7931). S obzirom na frekvencije istraženih krvnih polimorfa, buši je filogenetski znatno bliže istarsko i sivo dalmatinsko govedo od slavonsko-srijemskog podolca. Stavljajući u filogenetski međuodnos istražene pasmine s područja Hrvatske s drugim pasminama uočljiva je manja distanca buše iz Hrvatske naspram buše iz Makedonije i sivog goveda iz BiH. Buša je filogenetski najudaljenija naspram slavonsko-srijemskog podolca. Genotipizaciju buše treba nastaviti setom DNA markera, a rezultate na primjeren način implementirati u program njene revitalizacije.

Ključne riječi: buša, biokemijski polimorfizam, proteini krvi, frekvencija gena

Uvod

Buša je jedna od autohtonih hrvatskih pasmina goveda, koja je na ovim područjima oblikovana tisućljećima. Kraj devetnaestog stoljeća donosi velike

Doc. dr. sc. Ante Ivanković, prof. dr. sc. Pavo Caput, Miljenko Konjačić, dipl. ing. agr.;
Zavod za specijalno stočarstvo, Agronomski fakultet, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb
(kontakt e-mail: aivankovic@agr.hr); Dr. sc. Pero Mijić, Poljoprivredni fakultet u Osijeku,
Trg Sv. Trojstva 3, 31000 Osijek, Hrvatska.

promjene u gospodarstvo, što se odrazilo kroz intenzifikaciju poljoprivredne proizvodnje. Pasmine koje su bile ili postale proizvodno konkurentne opstale su i širile se na uzgojna područja manje konkurentnih pasmina goveda. Tijekom dvadesetog stoljeća nastavljen je trend stagnacije i pada veličine populacija goveda koje se nisu uspjele prilagoditi tržišno-proizvodnim zahtjevima. Buša se tijekom protekla dva stoljeća našla pred izazovima prilagodbe tržišno-proizvodnim zahtjevima i novim trendovima. Premda je početkom dvadesetog stoljeća u Kraljevini Hrvatske, Slavonije i Dalmacije bila dominantno zastupljena ($\approx 92\%$; Frangeš, 1903), početkom drugog svjetskog rata njen udio pada na 50% ukupne populacije goveda (Ogrizek, 1941), da bi krajem istog stoljeća gotovo nestala.

Program očuvanja autohtonih pasmina u Hrvatskoj iniciran je na istarskom govedu i slavonsko-srijemskom podolcu. Istodobno se pokušao potaknuti program zaštite buše zasnivanjem nukleus stada, no okruženje toga doba još nije imalo dovoljno sluha za takav oblik zaštite buše. Dosadašnji interes stručne i šire javnosti uglavnom se usredotočio na istarsko govedo i slavonsko srijemskog podolca, a buša je "zaboravljena". Znanstveni projekt "*Fenotipske i genetske odlike buše u Hrvatskoj*" (0178074) financijski poduprt od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa ima cilj odrediti aktualno stanje populacije buše u Hrvatskoj, s obzirom na veličinu, ugroženost (prema FAO kriterijima), fenotipska obilježja i genetsku strukturu na DNA razini. Istraživanje treba dati smjernice pasminskim standardima i osmišljavanju programa učinkovite zaštite buše. Obilasci terena pokazali su da buša nije potpuno izgubljena ali da je preostalo samo nekoliko desetaka grla "u tipu", čijim bi se pažljivim sustavnim uzgojem buša mogla revitalizirati (Konjačić i sur., 2004).

Polimorfni proteini kao genetski markeri, već od sredine dvadesetog stoljeća našli su praktičnu primjenu pri utvrđivanju genetskog profila pasmine, populacije i jedinke, što je poslužilo u filogenetskim studijama i određivanju međusobnih genetskih distanci (Caput i sur., 1992).

Cabannes i Serain (1955) prvi su uočili genetsku varijabilnost hemoglobina (Hb). Osim standardnih alelnih varijanti Hb^A i Hb^B, otkrivene su i druge varijante kao Hb^D i Hb^G, koje uglavnom nisu zastupljene u europskih pasmina goveda (Braend, 1971). Znani su i patološki oblici hemoglobina (Hb^S, Hb^C), te više od 200 drugih polimorfni oblika, kod kojih funkcionalni poremećaji često nisu zamjetni (Karlson, 1988).

Polimorfizam transferina (Tf) u goveda prvi spominje Ashton (1957). Standardno su zastupljene četiri alelne varijante (Tf^A, Tf^{D1}, Tf^{D2}, Tf^E). Aleli Hb^B, Hb^G i Hb^F otkriveni su u zebu goveda i njegovih križanaca (Ashton, 1959; Ashton i Lampkin, 1965; Osterhof i Van Herden, 1964).

Medjugorac (1995) za bušu i gatačko govedo spominje alelnu varijantu Tf^P. Polimorfizam postalbumina (Pa) prvi je opisao Gahne (1963), dok je albuminski polimorfizam uočen nešto kasnije (Braend i Efremov, 1965).

Dosad su istraživane frekvencije nekih polimorfni proteina autohtonih ugroženih pasmina goveda, slavonsko-srijemskog podolca (Gašpert i sur., 1990) i istarskog goveda (Caput i sur., 1992.). Utvrđene su frekvencije polimorfni krvnih alelnih varijanti sivog dalmatinskog goveda (Ivanković i Caput, 1997), koje je nastalo sustavnim oplemenjivanjem lokalne populacije buše. Stoga je razložno staviti u međuodnos frekvencije krvnih polimorfa istraženih autohtonih pasmina goveda kako bi uvidjeli njihovu filogenetsku originalnost.

Materijal i metode

Istraživanje je provedeno u sklopu projektnih zadataka snimanja stanja populacije buše na terenu. Od pregledanih više stotina goveda, na cijelom kraškom području od Risnjaka do Sniježnice, prikupljeni su uzorci krvi od nekoliko desetaka odabranih goveda "u tipu" buše.

Polimorfi krvi analizirani su u 29 uzoraka krvi uzetih od eksterijerno odgovarajućih buša "u tipu". Uzorak krvi za određivanje polimorfizma hemoglobina uzet je u epruvetu u kojoj se nalazio konzervans (EDTA). Eritrociti su odvojeni trokratnim centrifugiranjem uz ispiranje fiziološkom otopinom a hemolizat čuvan na -20°C do analize. Uzorak za određivanje polimorfizma serumskih proteina uzet je u epruvetu bez konzervansa, te nakon centrifugiranja serum je odvojen i čuvan na -20°C do analize. Genetske varijante hemoglobina (*Hb*) i transferina (*Tf*) određene su elektroforetski, u kontinuiranom puferskom sustavu (tris-glicinski pufer). Genetske varijante albumina (*Alb*) i postalbumina (*Pa*) određene su u diskontinuiranom puferskom sustavu. Obrada podataka rađena je statističkim paketom Arlequin (Schneider i sur., 2000)

Rezultati i rasprava

Analizom istraženih polimorfni proteina utvrdili smo njihovu polimorfnost. Registrirane su dvije alelne varijante za Hb, Alb i Pa, dok su kod Tf utvrđene tri alelne varijante. Osnovni pokazatelji o istraženim polimorfni proteinima buše prikazani su na tablici 1.

Tablica 1. - BROJ ALELA, EFEKTIVNI BROJ ALELA (ENA), UOČENA HETEROZIGOTNOST (HO), OČEKIVANA HETEROZIGOTNOST (He), SHANNON INDEKS INFORMATIVNOSTI (I), INFORMATIVNA VRIJEDNOST LOKUSA (PIC) I SREDNJA VJEROJATNOST ISKLJUČENJA (AEP) ISTRAŽENIH POLIMORFNIH PROTEINA KRVI BUŠE

Table 1. - NUMBER OF ALLELES, EFFECTIVE NUMBER OF ALLELES (ENA), OBSERVED HETEROZYGOSITY (HO), EXPECTED HETEROZYGOSITY (He), SHANNON'S INFORMATION INDEX (I), POLYMORPHIC INFORMATIVE CONTENT (PIC) AND AVERAGE EXCLUSION PROBABILITY (AEP) POLYMORPHIC BLOOD PROTEINS OF THE BUSHA

Lokus	Broj alela	ENA	Ho	He	I	PIC	AEP
Hb	2	1,071	0,069	0,068	0,150	0,064	0,032
Tf	3	2,140	0,655	0,542	0,865	0,447	0,254
Alb	2	1,147	0,138	0,131	0,251	0,120	0,060
Pa	2	1,488	0,414	0,334	0,510	0,274	0,137

Od istraženih polimorfni proteina najveća informativna vrijednost utvrđena je za Tf (PIC=0,447), na kome je utvrđen i najveći broj alelnih varijanti. Najmanja informativna vrijednost utvrđena je za Hb i Alb (I=0,150; 0,251), na kojima je uočena i najmanja heterozigotnost (0,069; 0,138). Po informativnoj vrijednosti Pa je na drugom mjestu, sa umjerenom razinom informativnosti (0,510) i uočene heterozigotnosti (0,414).

Testiranje χ^2 pokazalo je da odstupanje utvrđenih frekvencija genotipova spram očekivanih vrijednosti nije statistički signifikantno. Frekvencije genotipova i alelnih varijanti polimorfni proteina krvi buše prikazane su na tablici 2.

Tablica 2. - RASPODJELA HB, TF, ALB I PA GENOTIPOVA I FREKVENCIJA GENA BUŠE (n=29)

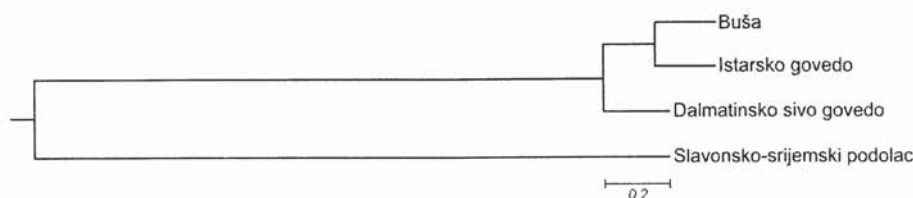
Table 2. - DISTRIBUTION OF HB, TF, ALB AND PA GENOTYPES AND GENE FREQUENCIES OF THE BUSHA (n=29)

Sistem System	Genotip Genotype	Broj Number	χ^2	Frekvencija gena Gene frequencies		
Hemoglobin Hemoglobin	AA	27	0,037	Hb ^A	0,9655	± 0,0239
	AB	2		Hb ^B	0,0345	
	BB	-				
Transferin Transferrin	AA	2	2,336	Tf ^A	0,3448	± 0,0647
	AD	15		Tf ^D	0,5862	
	AE	1		Tf ^E	0,0690	
	DD	8				
	DE	3				
	EE	0				
Albumin Albumin	FF	25	0,016	Alb ^F	0,9310	± 0,0333
	FS	4		Alb ^S	0,0690	
	SS	0				
Postalbumin Postalbumin	AA	0	1,973	Pa ^A	0,2069	± 0,0532
	AB	12		Pa ^B	0,7931	
	BB	17				

Istraživanja polimorfizma proteina krvi i mlijeka provode se desetljećima, od čega se krenulo i u genetskoj determinaciji autohtonih pasmina goveda na području Hrvatske. Rezultati prezentiranog i ranijih istraživanja (Gašpert i sur., 1990; Caput i sur., 1992; Ivanković i Caput, 1997) poslužili su za konstrukciju dendograma koji prikazuje filogenetske odnose istraživanih autohtonih hrvatskih pasmina goveda.

Grafikon 1. - UPGMA DENDROGRAM PASMINA GOVEDA U HRVATSKOJ, ZASNOVAN NA POLIMORFIZMU PROTEINA KRVNI

Graph 1. - UPGMA NEIGHBOUR-JOINING TREE CONSTRUCTED ON THE BASIS OF BLOOD PROTEIN POLYMORPHISM OF AUTOCHTHONOUS CATTLE BREEDS IN CROATIA



Uočljivo je da je slavonsko-srijemski podolac signifikantno filogenetski udaljen od ostalih pasmina goveda s kojima smo ga stavili u međudnos. S obzirom na poznate činjenice o genezi slavonsko-srijemskog podolca i tijeku poduzete akcije spašavanja nukleus stada od istrijebljenja, ovi rezultati nisu neočekivani. Sivo dalmatinsko govedo je očekivano filogenetski bliže buši, budući da je nastalo na temeljnoj populaciji buše koja je sustavno oplemenjivana sivim austrijskim govedom (*Tiroler Grauvieh*).

Tablica 3. - NEI-EVA MJERA GENETSKE IDENTIČNOSTI (IZNAD DIJAGONALE) I GENETSKE DISTANCE (ISPOD DIJAGONALE) AUTOHTONIH HRVATSKIH PASMINA GOVEDA

Table 3. - NEI' GENETIC IDENTITY (UPPER PART) AND GENETIC DISTANCE (LOWER PART) OF AUTOCHTHONOUS CATTLE BREEDS IN CROATIA

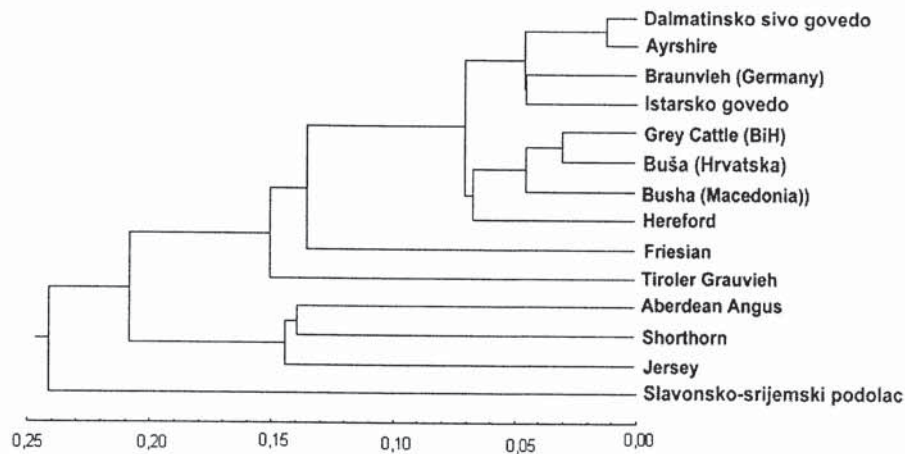
	Buša	Dalmatinsko sivo govedo	Istarsko govedo	Slavonsko-srijemski podolac
Buša	-	0,9956	0,9962	0,9687
Dalmatinsko sivo govedo	0,0044	-	0,9962	0,9592
Istarsko govedo	0,0038	0,0038	-	0,9575
Slavonsko-srijemski podolac	0,0318	0,0417	0,0434	-

Istražili smo dostupne podatke o frekvencijama krvnih polimorfa nekih srodnijih ali i filogenetski očekivano udaljenijih pasmina, te ih stavili u međudnos s istraženim frekvencijama polimorfa goveda u Hrvatskoj. Utvrđene

vrijednosti genetskih distanci ugrađene su u pripadajući dendrogram (grafikon 2), na kome je uočljivo grupiranje autohtonih hrvatskih pasmina goveda sa srodnijim i zemljopisno bližim pasminama.

Grafikon 2. - UPGMA DENDROGRAM KONSTRUIRAN NA TEMELJU FREKVENCIJA POLIMORFNIH PROTEINA KRV I RAZLIČITIH PASMINA GOVEDA (EUCLIDEAN LINKAGE DISTANCE)

Graph 2. - UPGMA TREE CONSTRUCTED ON THE BASIS OF FREQUENCIES OF POLYMORPHOUS BLOOD PROTEINS OF DIFFERENT CATTLE BREEDS (EUCLIDEAN LINKAGE DISTANCE)



Populacija buše u Hrvatskoj pokazuje najveću filogenetsku bliskost naspram sivog goveda iz BiH, te nešto manju bliskost spram buše iz Makedonije. Genetska distanca slavonsko-srijemskog podolca s obzirom na frekvencije polimorfnih krvnih proteina čini značajan otklon naspram ostalih pasmina goveda čije, su frekvencije polimorfa uključene u konstrukciju dendrograma.

Zaključci

Istraživanjem polimorfizma proteina krvi buše za četiri proteina (Hb, Tf, Alb i Pa) utvrđena je polimorfnost na svim lokusima. Utvrđene su frekvencije dviju alelnih varijanti hemoglobina (0,9655; 0,0345), triju varijanti transferina (0,3448; 0,5862; 0,0690), te dviju za albumin (0,9310; 0,0690) i postalbumin (0,2069; 0,7931). Najveća informativna vrijednost utvrđena je za transferin (PIC=0,447), dok je najmanja informativna vrijednost utvrđena za hemoglobin i albumin (0,064; 0,120), u kojih je najmanja heterozigotnost (0,069; 0,138). S

obzirom na frekvencije istraženih polimorfa krvi, buši je filogenetski znatno bliže istarsko i sivo dalmatinsko govedo od slavonsko-srijemskog podolca. Uočljiva je manja filogenetska udaljenost buše u Hrvatskoj spram buše u Makedoniji i sivog goveda u BiH. Genotipizaciju buše treba upotrijebiti setom DNA markera, a rezultate na primjeren način ugraditi u program njene revitalizacije.

LITERATURA

1. Ashton, G. C. (1957): Starch gel electroforesis of cattle serum proteins. *Bioch. J.*, 67: 328.
2. Ashton, G. C. (1959): Beta globulins alleles in some Zebu cattle. *Nature*, 184: 1135-1136.
3. Ashton, G. C., Lampkin, G. H. (1965): Serum albumin and transferrin polymorphism in East African cattle. *Nature*, Lond., 205: 209.
4. Braend, M., Efremov, G. (1965): Polymorphism of cattle serum albumin. *Nord. Vet. Med.* 17: 585.
5. Braend, M. (1971): Hemoglobin variants in cattle. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.*, 2: 15-21.
6. Cabannes, R., Serain, C. (1955): Heterogeneite de l'hémoglobine des bovines. Identification electrophoretique de deux hemoglobines bovines. *C.r. Soc. Biol., Paris*, 149: 7-10.
7. Caput, P., M. Posavi, M. Kapš, Jasmina Lukač-Havranek, M. Ernoić, Zlata Gašpert (1992): Genetski polimorfizmi krvi i mlijeka nekih pasmina goveda. *Stočarstvo*, 46: 323-336.
8. Efremov, G.D., T. Čižbanovski, R. Ilkovski, V. Peševska (1979): Proteinski i encimski polimorfizam kod rasa goveda u SR Makedoniji. 1. Distribucija hemoglobinskih, transferinskih, albuminskih, karboanhidraznih i amilaznih tipova. *Stočarstvo*, 33: 73-80.
9. Frangeš, O. (1903): *Die Buša*. Zagreb.
10. Gahne, B. (1963): Inherited variations in the post-albumins of cattle serum. *Hereditas*, 50: 126-135.
11. Gašpert Zlata, P. Caput, M. Posavi (1990): Polimorfizam transferina i hemoglobina podolskog goveda. *Agronomski glasnik*, 1-2: 31-36.
12. Geldermann, H. (1969): Darstellung und Beschreibung des Transferrin- und Postalbuminpolymorphismus bei einigen Deutschen Rinderrassen. *Disertacija*, Gottingen.
13. Ivanković, A., Caput, P. (1997): Genetski polimorfizmi proteina krvi sivog goveda u Hrvatskoj. *Stočarstvo*, 51: 163-172.
14. Karlson, P. (1988): *Biokemija*. Školska knjiga, Zagreb.
15. Konjačić, M., Ivanković, A., Caput, P., Mijić, P., Pranić, D. (2004): Buša u Hrvatskoj. *Stočarstvo*, 58 (3): 163-177.
16. Medjugorac, I. (1995): Genetischer Polymorphismus in Rinderrassen des Balkan und Phylogenie europäischer Rinder. *Disertacija*, München.
17. Ogrizek, A. (1941): K pitanju oplemenjivanja buše. *Gospodarski glasnik* 3: 36-38; 4: 67-68.
18. Osterhoff, D. R., J. A. H. Van Herden (1964): Tf^a-a new transferrin allele in cattle. *Proc. 9th Eur. Anim. B. G. Conf.*, Prag.
19. Schneider S., Roessli, D., Excoffier, L., 2000. Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.

GENETIC CHARACTERISATION OF THE BUSHA BASED ON POLYMORPHISM OF BLOOD PROTEINS

Summary

The Busha is one of Croatia's autochthonous cattle breeds which has been decreasing in numbers over the past decades and is now on the brink of its survival. It is for this reason that both scientific and public interests have been focused on the Busha, which until the middle of the twentieth century dominated in beef production. After the first studies were conducted on the exterior attributes of the Busha, attempts have been made to reveal its genetic structure to establish the basis by which it will be possible to more objectively determine the genetic purity of the remaining populations, and to handle more effectively its protection and revitalisation. The polymorphism of four blood proteins (Hb, Tf, Alb and Pa) was investigated, and polymorphism determined at all loci. The frequency of the two allele variations for Hb (0.9655; 0.0345) was determined, three variations for Tf (0.3448; 0.5862; 0.0690) and two for Alb (0.9310; 0.0690) and Pa (0.2069; 0.7931). Considering the frequency of the investigated blood polymorphism, the Busha is phylogenetically significantly more closely related to the Istrian and Grey Dalmatian cattle than to the Slavonian-Syrmian podolian cattle. In comparing the phylogenetic relationship of the studied breeds from Croatian localities with other breeds, it is evident that there is a smaller distance of the Busha from Croatia compared to the Busha from Macedonia and the Grey cattle from BiH. The Busha is phylogenetically most distant from the Slavonian-Syrmian podolian cattle. The genotypization of the Busha should be continued, with the set of DNA markers, and the results should be appropriately implemented in the program to revitalise the Busha.

Key words: Busha, biochemical polymorphism, blood proteins, gene frequencies

Primljeno: 28. 10. 2004.